

使君子科风车子亚科核糖体 DNA ITS 区序列分析及系统学意义*

谈凤笑¹, 施苏华^{**1}, 黄椰林¹, 杜雅青¹, 王玉国¹, 龚 洵^{1,2}

(1 中山大学生命科学院, 广东 广州 510275; 2 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

Analysis of nrDNA ITS Sequences in the Subfamily Combretaceae (Combretaceae) and Its Systematic Significance

TAN Feng - Xiao¹, SHI Su - Hua¹, HUANG Ye - Lin¹,
DU Ya - Qing¹, WANG Yu - Guo¹, GONG Xun^{1,2}

(1 School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

2 Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Key words: Combretaceae; Combretaceae; Phylogeny; ITS regions; nrDNA

关键词: 使君子科; 风车子亚科; 系统发育; ITS 区; 核糖体 DNA

中图分类号: Q 949, Q 75 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253 - 2700(2001)02 - 0239 - 04

使君子科 (Combretaceae) 主要分布于热带非洲和亚洲, 美洲和澳洲也有少量分布。全世界有约 20 属, 近 500 多种 (Exell & Stace, 1966)。我国有 6 属约 25 种, 均分布于长江以南各省区, 主产云南及海南岛 (徐廷志, 1984)。其中, 除使君子属 (*Quisqualis*) 仅有 2 种外, 榄仁树属 (*Terminalia*) 和风车子属 (*Combretum*) 是全科最大的两属, 榆绿木属 (*Anogeissus*) 在我国只有一种, 它是我国北热带季节性雨林中的建群树种之一 (傅立国, 1992), 萼翅藤属 (*Calycopteris*) 则为亚洲热带山地特有的单种属 (傅立国, 1992), 而榄李属 (*Lumnizera*) 是构成热带海岸红树林的成分之一, 具有重要的生态学意义。

该科自建立以来, 科内的分类问题上一一直较为混乱 (De Candolle, 1828; Engler & Diels, 1899; Exell, 1931; Exell & Stace, 1966)。在 De Candolle (1828) 的系统中, 使君子科仅分为榄仁族 *Terminalieae* 和风车子族 *Combreteae* 2 个族。Engler & Diels (1899) 及 Exell (1931) 将使君子科分成 *Strephonematoideae* 亚科和风车子亚科 *Combretaceae*, 后者又被划分为 4 个族: 1) 风车子族, 含风车子属和使君子属等 6 属; 2) 榄仁族, 包括榄仁树属和榆绿木属等 6 属; 3) 萼翅藤族 *Calycopterideae*, 仅萼翅藤一属; 4) *Laguncularieae* 族, 含榄李属等 3 属。Exell & Stace (1966) 又根据形态学和解剖学特征, 提出了一个新的分类系统,

* 基金项目: 国家杰出青年科学基金 (39825104), 国家自然科学基金 (30070053)、广东省自然科学基金 (001223)、教育部高等学校骨干教师资助计划资助项目。

** 通讯作者 E-mail: jsasah@zsu.edu.cn

收稿日期: 2001 - 01 - 17, 2001 - 03 - 05 接受发表

认为除了作为红树林成分的榄李属所在的 *Laguncularieae* 族应予保留外, 风车子亚科中 *Laguncularieae* 族以外的其余 3 个族应合并为一个族——风车子族。尽管近年来在形态解剖学 (Rajput 等, 1999)、孢粉学 (El Ghazlai 等, 1998)、细胞学 (Ohri, 1996)、植物化学 (Collins 等, 1992) 及分子系统学 (Conti 等, 1996) 等方面进行了大量的研究, 但迄今为止各系统均未得到很好的检验, 利用 DNA 序列对使君子科进行系统学研究尚未见报道。由于 Engler 和 Diels 系统风车子亚科的所有 4 个族我国均有代表属, 因此本研究采用直接 PCR 测序方法, 对我国使君子科全部 6 属植物核糖体 DNA ITS 区 (包括 5.8S 编码区) 的序列进行了分析, 旨在通过研究中国使君子科植物的分子系统发育, 对使君子科风车子亚科内的系统关系进行探讨, 并为深入研究各属间亲缘关系提供更为详实的分子证据。

1 材料和方法

1.1 材料来源

实验材料包括了我国分布的使君子科 6 属 13 种 14 个样品。基于现有的分子数据——叶绿体 *rbcL* 基因序列数据构建的系统树 (Conti 等, 1996) 和 APG 系统 (APG, 1998), 本研究选择了千屈菜科 (Lythraceae) 的千屈菜 *Lythrum salicaria* 和柳叶菜科 (Onagraceae) 的草龙 *Ludwigia hyssopifolia* 作为复合外类群。具体的材料种类及来源见表 1。

表 1 本研究所用使君子科与外类群的样品来源

Table 1 Accessions of Combretaceae and outgroups sampled in this study.

Species	Voucher*	Collection Source	GenBank Acc. No.
阿娜树 <i>Anogeissus leiocarpus</i>	Huang S. 9942103	Jianfengling, Hainan	AF334766
榆绿木 <i>Anogeissus acuminata</i> var. <i>lanceolata</i>	Zhang 99111501	Yingjiang, Yunnan	AF334765
粤超藤 <i>Calycotome floribunda</i>	Gong 200052301	Yingjiang, Yunnan	AF334770
风车子 <i>Combretum alfredii</i>	Tang 99031504	Lipu, Guangxi	AF160471
石风车子 <i>Combretum uallichii</i>	Shi 990703005	Kunming Botanical Garden, Yunnan	AF208731
红榄李 <i>Lumnitzera littorea</i>	Chen 990601	Dongzaijiang, Hainan	AF160468
榄李 <i>Lumnitzera racemosa</i>	Huang 99050301	Dongzaijiang, Hainan	AF160467
小花使君子 <i>Quasqualis caudata</i>	Huang 98121212	Xishuangbanna, Yunnan	AF160469
使君子 <i>Quasqualis indica</i>	Tang 99031505	Lingshuan, Guangxi	AF160470
毗黎勒 <i>Terminalia bellirica</i>	Huang 98121216	Kunming Botanical Garden, Yunnan	AF334768
诃子 <i>Terminalia chebula</i>	Huang 9942102	Jianfengling, Hainan	AF334769
海南榄仁 <i>Terminalia hainanensis</i>	Ye 99031303	Campus of Zhongshan Uni., Guangdong	AF160466
木勒榄仁 <i>Terminalia mulleri</i> (1)	Liao 990308035	Jianfengling, Hainan	AF160472
木勒榄仁 <i>Terminalia mulleri</i> (2)	Huang 98121215	Kunming Botanical Garden, Yunnan	AF334767
草龙 <i>Ludwigia hyssopifolia</i> **	Yuan 200072401	Campus of Zhongshan Uni., Guangdong	AF334771
千屈菜 <i>Lythrum salicaria</i> **	Lei 05	Wuhan Botanical Garden, Wuhan	AF334772

* 凭证标本存中山大学植物标本馆 ** 外类群

* Voucher specimens are stored in SYS (Zhongshan University) ** outgroup

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 的提取、纯化, PCR 扩增, ITS 测序

采用改进了的 CTAB 法 (Doyle 等, 1987) 提取总 DNA, 用玻璃粉法对总 DNA 进行纯化。以 ITS4 和 ITS5 作引物, 按程序 (94℃ 4 min; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30

个循环; 72℃ 5 min) 进行 PCR 扩增, 得到核糖体 DNA 的 ITS 片段 (包括 ITS-1, 5.8S 和 ITS-2)。PCR 反应产物用 QIAquick PCR purification kit 进行纯化。PCR 纯化产物经 Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit, 以 α -³⁵S-dATP 放射性同位素标记, 分别以 N18L18 (5'AAG TCG TAA CAA GGT TTC 3')、ITS4 为测序引物进行手工测序 (具体操作见 Shi 等, 1998)。部分样品采用 377 型自动测序仪 (Applied Biosystems, CA) 进行测序 (北京农业大学)。

1.2.2 数据分析

所测定的使君子科 6 属 13 种植物 (14 个样品) 的核糖体 DNA ITS1, 5.8S, 和 ITS2 区核苷酸序列 (607-613bp) 已在 GenBank 注册, 注册号见表 1。测得的 ITS 序列数据用 ClustalX 程序 (Thompson 等, 1997) 进行对位排列。用 PAUP4.0 软件包 (Swofford, 1999) 对序列进行统计和分支分析, 计算各类群间的核苷酸差异数及差异较正值 (Knuv 值)。采用最大简约法 (maximum parsimony method) 获得最大简约树 (MPTs); 应用自展法 (bootstrap) 检验系统树, 自展次数为 1000 次。

2 结果与讨论

排序后的 ITS 序列总长度为 658, 其中变异位点为 395, 信息位点为 254。ITS 数据分析所得的最大简约树见图 1。树的总长度为 860, CI 值为 0.7558, RI 值为 0.7283, RC 值为

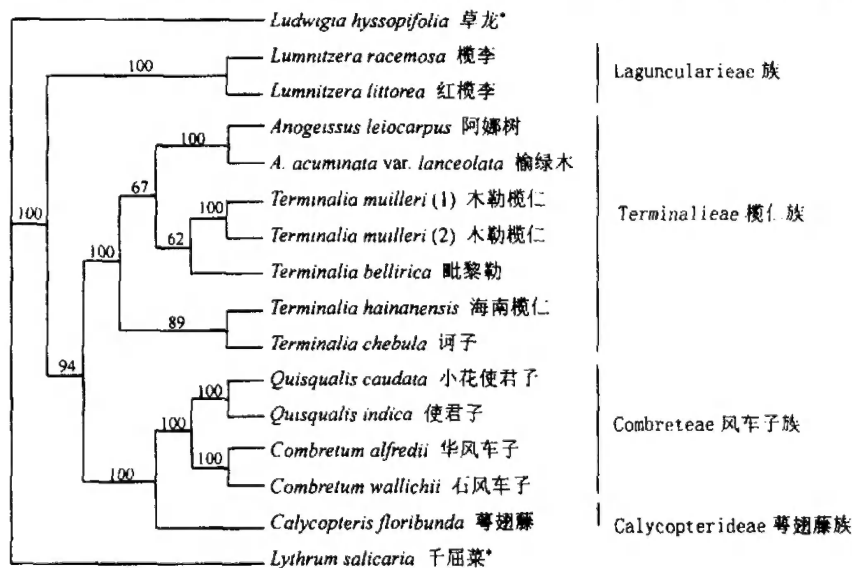


图 1 车子亚科的 ITS 最大简约树 (数字代表各分支的自展数据支持率; * 表示外类群)

Fig.1 The single most parsimonious tree of Combretaceae based on ITS regions (length = 860, CI = 0.7558, RI = 0.7283, HI = 0.2442, RC = 0.5505). Gaps were treated as missing data. Values above branches are bootstrap supports (%) for the clades. Asterisk (*) indicates outgroup.

0.5505。ITS 系统树表明, 风车子亚科中的 4 个族 (Engler 和 Diels, 1899) 分成 2 支演化: 最基出的一支由红树林成分榄李属所在的 *Laguncularieae* 族单独构成; 另一支由风车子族、萼翅藤族和榄仁族共同组成。这一支又分为二支, 榄仁族的榄仁树属与榆绿木属组成一单系分支, 榄仁族内部呈复系演化特征: 在榄仁树属内, 木勒榄仁 (*T. mulleri*) 与毗黎勒 (*T. bellirica*) 构成一支, 两者与榆绿木属呈平行关系, 海南榄仁 (*T. hainanensis*) 与诃子 (*T. chebula*) 则构成榄仁族最外部的分支。因此, ITS 证据支持榄仁树属与榆绿木属有较近的亲缘关系, 但由于两者在形态学上的差异较大, 进一步的深入研究, 特别是利用不同的基因序列探讨榄仁树属内的系统发育关系很有必要; 与榄仁族平行演化的另一支由风车子族和萼翅藤族组成, 表明这两者的关系密切。在风车子族内使君子属与风车属各自独立为一支, 尽管这两者形态与解剖学等方面特征较相近 (Exell, 1931; Exell & Stace, 1966), 但 ITS 结果表明两属分别作为一个单独的类群是成立的。从本文结果分析看, Exell & Stace (1966) 将风车子族、萼翅藤族和榄仁族合并为一个族的处理比较合理。

致谢: 承中山大学叶创兴教授、廖文波博士, 广西师范大学唐绍清博士, 海南大学黄世满先生, 海南热带学院陈守才先生, 美国哈佛大学标本馆 David E. Boufford 博士提供部分实验材料和参考资料。

〔参考文献〕

- 徐廷志, 1984. 中国植物志第 53 卷第 1 分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1-28
- 傅立国, 1992. 中国植物红皮书第 1 册 [M]. 北京: 科学出版社, 220-227
- Angiosperm Phylogeny Group, 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants [J]. *Ann Missouri Bot Gard*, 85: 531-553
- Collins D J, Pilotti C A, Wallis A F A, 1992. Triterpene acids from some Papua New Guinea *Terminalia* species [J]. *Phytochemistry*, 31 (3): 881-884
- Conti E, Litt A, Sytsma K J, 1996. Circumscription of myrtales and other relationships to other rosids: evidence from *rbcl* sequence data [J]. *J Bot*, 83 (2): 221-233
- De Candolle, A P, 1828. *Memoire sur la famille des Combretacees* [M]. Geneva: Barbezat et Delarue
- Doyle J J, Doyle J L, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 19: 11-15
- El Ghazlai G E B, et al, 1998. Combretaceae. In: H. Brown [J]. *World Pollen and Spore Flora*, 21: 1-40
- Engler A, Diels L, 1899. *Monographien Afrikanischer Pflanzen - Familien und Gattungen*, III & IV: Combretaceae [M]. Leipzig: Engelmann
- Exell A W, 1931. The genera of Combretaceae [J]. *J Bot*, 69: 113-128
- Exell A W, Stace C A, 1966. Revision of the Combretaceae [J]. *Bol Soc Brot*, ser 2, 40: 5-26
- Ohri D, 1996. Genome size and polyploidy variation in the tropical hardwood genus *Terminalia* (Combretaceae) [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 200 (3-4): 225-232
- Rajput K S, Rao K S, 1999. Nucleated wood fibres in some members of Combretaceae [J]. *IAWA J*, 20 (1): 79-83
- Shi S H, Chang H T, Chen Y Q, et al, 1998. Phylogeny of the Hamamelidaceae based on the ITS sequences of nuclear ribosomal DNA [J]. *Biochem Syst Evol*, 25: 55-69
- Swofford D L, 1999. PAUP* 4.0. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) [M]. Sunderland: Sinauer Associates
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, 1997. The Clustalx windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucl Acids Res*, 25: 4876-4882